

ANALISE DA DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO NO AGROSSISTEMA CAFEIRO ORGÂNICO ATRAVÉS DO DGGE (DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS).

Andréa SCARAMAL¹ E-mail andreascaramal@yahoo.com.br, Arnaldo COLOZZI-FILHO², Diva S. ANDRADE²

¹Graduanda em Ciências Biológicas, UNIFIL, Londrina, Bolsista CNPq/PIBIC/IAPAR, estagiária no Lab. Microbiologia do Solo, IAPAR, CP 481, CEP 86001-970, Londrina, PR ; ²Dr., Pesquisador em Microbiologia do Solo, IAPAR. Apoio financeiro Programa PR 12 Meses.

Resumo:

Os microrganismos do solo atuam nos processos de decomposição da matéria orgânica, participando diretamente no ciclo biogeoquímico dos nutrientes e, conseqüentemente, mediando a sua disponibilidade no solo. Os diferentes manejos do solo e das culturas podem alterar a comunidade microbiana do solo com efeitos imprevisíveis sobre o funcionamento dos agroecossistemas. O manejo orgânico do cafeeiro baseia-se na condução das lavouras através da aplicação de fertilizantes orgânicos, e pouco se sabe sobre seu efeito sobre a comunidade de organismos do solo. Embora a matéria orgânica seja o combustível natural para a atividade biológica no solo, alguns grupos de organismos podem ser estimulados ou inibidos em função da qualidade da matéria orgânica aplicada, o que pode alterar a diversidade microbiana no solo. O DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) é uma técnica desenvolvida para o estudo da biodiversidade de microrganismos que, a partir de uma amostra de DNA extraída de diferentes situações (ex: solo, tecidos, etc), possibilita a separação de fragmentos de DNA de mesmo comprimento, mas diferentes sequências nucleotídicas, sendo portanto capaz de detectar até mesmo organismos não cultiváveis.

Neste trabalho avaliou-se a população de fungos de solo, de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e de organismos de solo do domínio Archaea, em cultivos comerciais de cafeeiros adensados conduzidos em manejo convencional, orgânico e orgânico arborizado, no município de Santa Mariana-Pr. Para as análises da diversidade microbiana, extraiu-se o DNA total em três amostras de solo coletadas na projeção da copa do cafeeiro nos tratamentos Convencional, Orgânico e Orgânico arborizado. O DNA total foi extraído com o Kit Soil DNA Isolation® (Mo Bio, Laboratories, Inc). A amplificação foi realizada em termociclador, com os primers que flanqueiam as regiões 18S e 16S. Após a quantificação, os produtos foram analisados em géis de poli-acrilamida com gradiente de desnaturação, em uma unidade DGGE da Bio-rad. O padrão de bandamento foi diferente entre a comunidade de fungos de solo a população de FMA e a comunidade de Archaea. Em todos os grupos de organismos estudados observou-se padrão múltiplo de bandamento, indicando diversidade genética e a riqueza de espécies. Para fungos de solo não teve uma variabilidade na riqueza das espécies nos diferentes tratamentos, tendo uma diversidade genética de 17% entre os manejos, convencional e orgânico. Para os FMA se observou diferenças na riqueza de espécies e na variabilidade genética entre as populações de FMAs nos tratamentos convencional e orgânico arborizado. Entretanto, observou-se 27% de diferenças na variabilidade genética entre o tratamento orgânico com os demais. Para a população de Archaea a riqueza de espécies destes organismos foi maior no manejo convencional e menor no orgânico arborizado, tendo o mesmo padrão para a variabilidade genética.

Palavras chave: fungos de solo; micorrizas arbusculares; Archeae; *Coffea arabica* L.

SOIL MICROBIAL DIVERSITY ANALYSIS IN ORGANIC COFFEE AGROSSYSTEM BY DGGE (DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS).

Abstract:

The organic coffee crop management improves soil fertility and the ability of many soil microorganisms to grow but the microbial community diversity responsible for several biochemical processes has not been studied in detail in these agro-ecosystems. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) analysis is a power tool to study diversity of uncultured soil microorganisms, therefore, in this work, we present data from DGGE examining the combined effects of organic crop coffee and shading with "sibipiruna" (*Caesalpinia peltophoridae*) on the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), fungi and Archaea domain in a soil microbial community in Santa Mariana, Paraná, Brazil. Soil samples were taken from a field cultivated with coffee crops with the following managements: (1) conventional system; (2) organic system and (3) organic coffee cultivated under shading for extraction of total DNA by using the Kit Soil DNA Isolation® (Mo Bio, Laboratories, Inc). PCR amplifications were carried out in a Gene Amp PCR System (MJ) with primers, which flanked the 18S and 16S regions and the amplified products were analyzed by DGGE (Bio-rad) polyacrylamide gels. It was observed DGGE profiles with several bands in all microorganisms assessed indicating genetic diversity and richness of species. Coffee management had marked effects on Archaea population assessed by DGGE-banding patterns and showed higher species richness and diversity genetic in the soil under conventional management, but there was little evidence of a change in genetic diversity and specie richness of soil fungi with only 17% of differences. On the other hand, the AMF with 27%

of diversity did present changes on richness of species between organic and the other management systems (Conventional and organic-shading). This result of diversity of no cultured microorganisms from soil with coffee crops contributes to our understanding of the ecological significance of Archaea as a component of microbial communities in non-extreme environments.

Key words: soil fungi; arbuscular mycorrhiza; Archeae; *Coffea arabica* L.

Introdução

O aumento do consumo de produtos agrícolas orgânicos tem impulsionado o desenvolvimento e a adoção de técnicas de cultivo agroecológicas baseadas em regras de produção orgânica, que pressupõem a eliminação do uso de fertilizantes minerais e a não aplicação de agroquímicos para controle de pragas e doenças. Este tipo de manejo acarreta uma nova dinâmica no agrossistema como um todo e, principalmente, sobre a atividade biológica no solo. Os sistemas orgânicos de cultivo baseiam-se na matéria orgânica do solo como principal fonte de nutrientes para as plantas, o que somente se viabiliza através da atividade decompositora e recicladora realizada pela biota do solo. A biota do solo é composta pelo conjunto de organismos componentes da fauna edáfica e da microbiota que, juntos correspondem a biodiversidade de organismos do solo. Esta biodiversidade genética garante a diversidade funcional no solo e tem relação direta com a planta cultivada e com a dinâmica da matéria orgânica no solo, sendo portanto fundamental conhecê-la e monitorá-la, como um indicador de mudança em resposta ao manejo praticado.

Os microrganismos têm um papel importante no funcionamento e na sustentabilidade dos agrossistemas porque atuam na troca de nutriente no sistema solo-planta e, principalmente, na ciclagem de compostos orgânicos (Colozzi Filho, 1999), além de atuarem como agentes reguladores nos principais processos bioquímicos no solo tais como transformações inorgânicas de N, P e S, transformações de elementos metálicos produção de metabólitos, degradação de agroquímicos e alterações nas características físicas do solo (Wardle & Hungria, 1994). Portanto, a conservação da biodiversidade e a utilização de práticas de manejo do solo e das culturas que estimulem a atividade microbiana no solo são fundamentais para a manutenção da sustentabilidade dos agrossistemas.

Fungos e bactérias de solo são onipresentes no ambiente e cumprem uma gama de funções ecológicas importantes, em particular aqueles associados à mineralização de nutrientes no solo (Anderson & Cairney, 2004). Apesar disto, a compreensão da dinâmica das populações de fungos de solo e bactérias é um desafio, em especial fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), devido à dificuldade de cultivo e identificação destes organismos. Estudos através de isolamentos em meios de cultivo artificiais são difíceis de serem executados e muitas vezes fornecem resultados não conclusivos. Entretanto este desafio está sendo vencido com o auxílio de novas técnicas baseadas no uso de marcadores moleculares. Recentes investigações sobre a ecologia de fungos do solo estão sendo realizadas através da extração do material genético diretamente do solo ou de raízes colonizadas, o que tem trazido significativo aumento na compreensão da diversidade de fungos em raízes de plantas e/ou solo. (Siqueira & Moreira, 2002).

Análises de fragmentos de restrição de DNA amplificados por PCR (Polimerase chain reaction) são uma ferramenta poderosa que permite a detecção de moléculas de ácidos nucleicos específicos presentes em pequenas quantidades (Stefan & Atlas, 1991) e tem sido aplicada com sucesso na identificação de microrganismos. O uso da PCR com iniciadores que flanqueiam a região genômica do ITS (Internal transcribed spacer) (Redecker et al., 1997) ou mesmo iniciadores específicos tem permitido a identificação taxonômica de microrganismos sem os problemas de ocorrência de variações nos caracteres morfológicos, que tanto dificultam a taxonomia tradicional (Colozzi- Filho, 1999). Também o método DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) pode ajudar nos estudos sobre ecologia e diversidade microbiana no solo. Essa técnica foi primeiramente utilizada por Muyzer et al. (1993), onde os produtos por PCR são separados em géis de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante com concentrações crescentes de formamida e uréia. A separação de fragmentos de tamanhos semelhantes, mas de composição diferente, baseia-se na mobilidade eletroforética das moléculas de DNA parcialmente desnaturadas em géis de poliacrilamida, as variações na composição de nucleotídeos dos diferentes fragmentos de DNA determinem seu comportamento de migração no gel, fazendo com que fragmentos diferentes terminem em sua migração em posições diferentes. A migração dos fragmentos de DNA no DGGE é governada não apenas pela composição de nucleotídeos (G+C), mas também pelas interações entre estes dentro da molécula (Breslauer et al, 1996). A técnica do DGGE permite investigar as comunidades de microrganismos do solo e é capaz de apontar mudanças dentro da composição da comunidade em função de atividades antrópicas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade microbiana do solo no agrossistema cafeeiro adensado, conduzido de modo convencional, em manejo orgânico e em manejo orgânico arborizado, através do uso de marcadores moleculares e do DGGE.

Material e Métodos

Este estudo foi realizado em amostras compostas de solos, coletadas na profundidade de 0 a 20cm, na projeção da copa de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) em lavouras comerciais situadas no município de Santa Mariana-Pr. As lavouras de cafeeiros são da variedade Obatã, cultivadas em espaçamento adensado de 2,5 m x 0,8m em todos os tratamentos. Os tratamentos foram cafeeiro adensado em manejo convencional, orgânico e orgânico arborizado. Na

lavoura conduzida em manejo convencional são feitas fertilizações minerais de acordo com as exigências da cultura, baseadas nas análises anuais de solos. Nos tratamentos orgânico e orgânico arborizado são utilizados esterco e material vegetal compostados, aplicados anualmente. No tratamento orgânico sombreado utilizou-se como sombreadora a Sibipiruna, em espaçamento 14m x 14m.

O DNA total foi extraído do solo em três repetições por tratamento. Para a extração do DNA total do solo, utilizou-se o Kit Soil DNA Isolation® (Mo Bio, Laboratories, Inc). Para tanto, foi adicionado 1g de solo a tubos contendo resina de sílica, para agitação no equipamento Flat bed® (Mo Bio vortex). O DNA foi purificado e armazenado a -20°C até o momento de sua utilização na reação de PCR (Polimerase Chain Reaction). Para a amplificação de fragmentos do rDNA 18S de fungos de solo, utilizou-se o conjunto de iniciadores de amplificação NS31GC e ITS4. Para a amplificação de fragmentos do rDNA 16S de Archaea, utilizou-se o conjunto de iniciadores de amplificação Arch21F9 e Arch958R. Para aumentar a concentração do DNA amplificado, realizou-se uma reação de Nested PCR. A técnica de Nested PCR se baseia em amplificar, em uma segunda etapa, uma sequência mais específica da região do DNA que foi originalmente amplificado na primeira reação de PCR. Para a segunda amplificação, foram utilizados os iniciadores NS31GC e NS41 para fungos em geral, NS31GC e AM1 para FMA e Ahrc340FGC e Arch519R para Archaea.

Os amplicons do rDNA de Fungos e FMA, foram separados por eletroforese em gel de poli-acrilamida com gradiente desnaturante. Os géis de acrilamida:bisacrilamida (37,5 : 1; m:m) 6%, foram preparados com um gradiente de solução variando de 32% a 50% para fungos e FMA e usando duas soluções: uma solução desnaturante 100%, contendo 7M uréia e 40% formamida e outra solução 0% de uréia e formamida. A eletroforese foi feita a 60°C e 75 V constantes, por 17 horas, em um sistema de eletroforese vertical DCode (Biorad), com solução tampão 0,5X TAE (10 mM Tris-acetato, 0,5 mM EDTA pH 8,0). Após a eletroforese, o gel foi lavado três vezes com água destilada. Corou-se o gel com brometo de etídeo e a visualização se fez sob luz UV. Para os amplicons do rDNA 16S de Archaea foi utilizado um gel de acrilamida:bisacrilamida 8%, com um gradiente de solução variando de 15% a 55%. A eletroforese realizada a 60°C e 200V constantes, por 3 horas. Para a análise dos amplicons utilizou-se o programa Bionumerics, determinando-se as diferenças através do coeficiente de Jaccard.

Resultados e Discussão

A aplicação das técnicas de biologia molecular que usam marcadores moleculares para o estudo do material genético de comunidades de microrganismos convivendo em ambientes naturais tem sido realizada com sucesso, com o objetivo de detectar a diversidade real dos organismos do solo, o que tem levado a descoberta de novas espécies, estimando-se hoje que o número de espécies real ainda está muito aquém do atualmente conhecido (Moreira & Siqueira, 2002).

Os resultados da riqueza de espécies e da diversidade genética de fungos de solo, analisado pela técnica do DGGE, em lavouras de café conduzidas sob diferentes manejos são apresentados na figura 1.

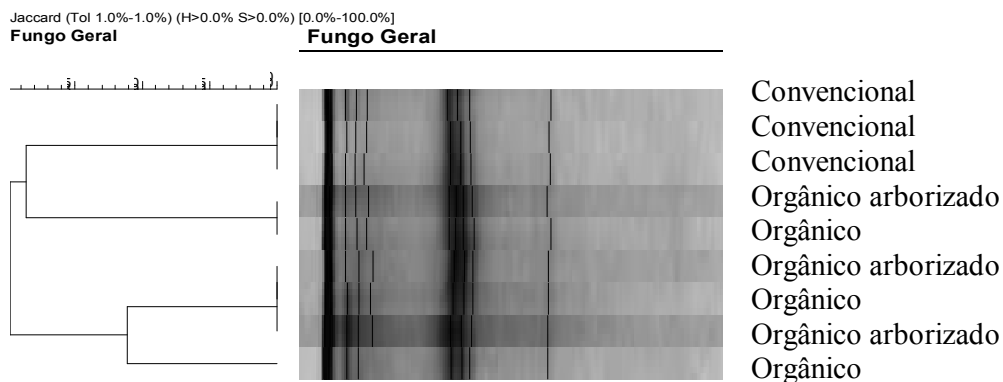


Figura 1. Análise de DGGE de seqüências parciais da região 18S do DNA total de solo amplificado com os iniciadores NS31GC e NS41 para fungos de solo, em agrossistema cafeeiro conduzido de modo convencional, orgânico e orgânico arborizado. As linhas correspondem a três pontos de amostragem coletados em transecto em cada tratamento.

Pelo número de amplicons obtidos, não se observou variação na diversidade de fungos em função dos diferentes tratamentos estudados (Fig. 1). Entretanto, observou-se variabilidade genética de 17% nas comunidades destes organismos entre os tratamentos manejo convencional e manejo orgânico (orgânico e orgânico arborizado). Segundo Eichner et al.; (1999), o número de amplicons observados no gel desnaturante permite uma estimativa da riqueza de espécies e a intensidade relativa de bandas reflete, grosseiramente, a abundância de cada espécie na comunidade. Estes autores relatam a hipótese de que solos similares possuem comunidades de microrganismos similares, o que concorda com os resultados obtidos neste trabalho.

Os resultados da riqueza de espécies e da diversidade genética de fungos micorrízicos arbusculares são apresentados na figura 2.

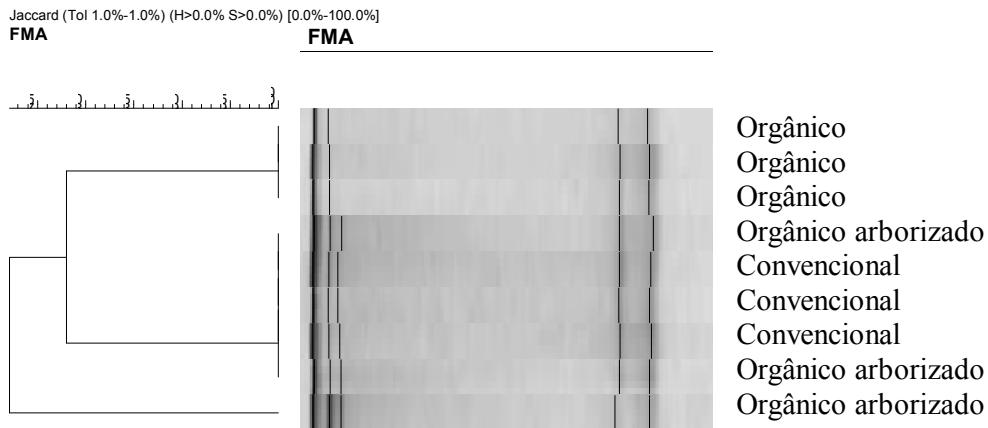


Figura 2. Análise de DGGE de seqüências parciais da região 18S do DNA total de solo amplificado com os iniciadores NS31GC e AM1 para fungos micorrízicos arbusculares, em agrossistema cafeeiro conduzido de modo convencional, orgânico e orgânico arborizado. As linhas correspondem a três pontos de amostragem coletados em transecto em cada tratamento.

Não se observou diferenças na riqueza de espécies e na variabilidade genética entre as populações de FMAs nos tratamentos convencional e orgânico arborizado. Entretanto, observou-se 27% de diferenças na variabilidade genética entre o tratamento orgânico com os demais. Neste mesmo tratamento observou-se menor número de amplicons, o que reflete menor riqueza de espécies no tratamento orgânico. A menor riqueza de espécies de FMA no tratamento orgânico pode estar relacionada a ao efeito negativo da aplicação concentrada de resíduos animais sobre a colonização micorrízica, conforme relatado por Nakatani & Colozzi-Filho, (2004)

Os resultados da riqueza de espécies e da diversidade genética de arqueobactérias são apresentados na Figura 3.

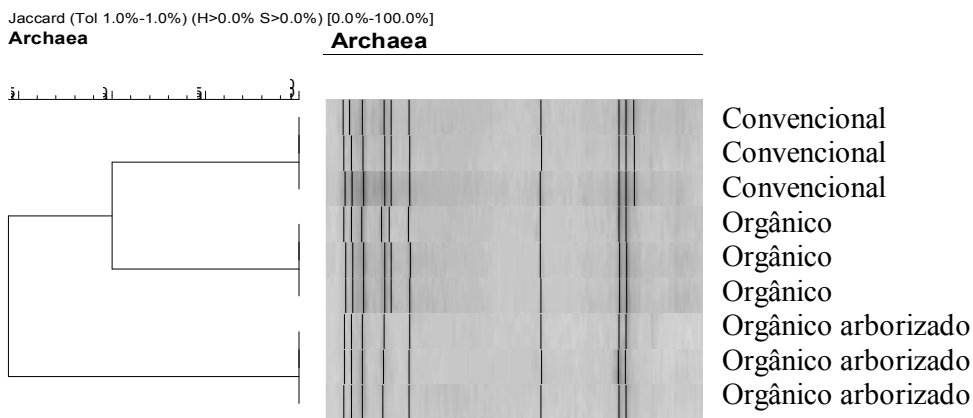


Figura 3. Análise de DGGE de seqüências parciais do DNA total de solo amplificado com os iniciadores Arch340FGC e Arch519R para Archaea, em agrossistema cafeeiro conduzido de modo convencional, orgânico e orgânico arborizado. As linhas correspondem a três pontos de amostragem coletados em transecto em cada tratamento.

Observou-se que a adoção de práticas de manejo conservacionistas reduziram a riqueza de espécies de arqueobactérias no solo. A riqueza de espécies destes organismos foi maior no manejo convencional e menor no orgânico arborizado. O mesmo comportamento foi observado em relação à variabilidade genética, cuja similaridade foi menor entre os tratamentos convencional e orgânico arborizado (85%) do que entre os tratamentos convencional e orgânico (90%).

O domínio Archaea engloba microrganismos que se desenvolvem até em ambientes com características extremas de temperatura, salinidade, pH e ausência de O₂, o que indica que são adaptados a condições adversas de crescimento. A

maior riqueza de espécies e a maior variabilidade genética destes organismos observada no tratamento convectivo pode indicar condições mais estressantes à atividade biológica no solo neste tipo de manejo. Por outro lado, Saanda, et.al. (1999), utilizando o DGGE e o mesmo conjunto de iniciadores utilizados no presente trabalho, encontraram uma diminuição da diversidade de Archaea em solo agrícola, porém em função da contaminação com metais pesados. Ao mesmo tempo os autores sugerem que esses microrganismos podem ser utilizados como indicadores de poluição por metais.

Portanto, o manejo do solo alterou tanto a diversidade de espécies quanto a diversidade genética dos organismos de solo avaliados, sendo este efeito diferenciado em função do grupo de organismos avaliado.

Conclusões

O manejo do solo alterou a riqueza de espécies e ocasionou variabilidade genética nas populações de fungos de solo, de fungos micorrízicos e de Archaea.

Referências Bibliográficas:

- Andreson, I.C.; Cairney, W.G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 6(8), p. 769-779, 2004 .
- Breslauer, K.J.; Frank, R.; Blocker, H.; Marky, L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v. 83, p. 3746-3750, 1986.
- Colozzi Filho, A. Dinâmica populacional de fungos micorrízicos arbusculares no agrossistema cafeeiro e adubação verde com leguminosas. 1999. 106 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Colozzi Filho, A.; Balota, E.L.; Andrade, D.S. Microrganismos e processos biológicos no sistema plantio direto. In: Siqueira, J. O.; et al. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas, Lavras, MG. 1999
- Eichner, C.A.; Erb, R.W.; Timmis, K.N.; Döbler, I.W. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p. 102-109, 1999.
- Redecker, D.; Thierfelder, H.; Walker, C.; Werner, D. Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.63, n.5, p.1756-1761, 1997.
- Sandaa, R.A.; Enger, O.; Torsvik, V. abundance and diversity of Archaea in heavy-metal contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, n.8, p.3293-3297, 1999.
- Steffan, R.J.; Atlas, R.M. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.45, p.137-161, 1991.
- Muyzer, G., De Wall, E.C., Uitterlinden, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 59: 695-700, 1993.
- Wardle, D.A.; Hungria, M. A biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M., eds. *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília, EMBRAPA-SPI, p. 195-216, 1994.

Agradecimentos: À Embrapa-Soja/Laboratório de Biotecnologia do Solo pela possibilidade de utilização do programa Bionumerics para a análise dos géis.